

surgical procedure.

## 18. がん細胞の鉄依存性細胞死を誘導する酸化脂質の生成と拡がり

神徳 亮介<sup>1,2</sup>, 久保田知里<sup>1</sup>, 好本 裕平<sup>2</sup>  
鳥居 征司<sup>1</sup>

(1 群馬大・生調研・分泌制御分野)

(2 群馬大院・医・脳神経外科学)

【背景と目的】 フェロトーシスは RAS ががん細胞が一部の抗腫瘍化合物に誘起される細胞死として見出されたが、近年、脳梗塞による神経細胞死や虚血性の心筋、腎上皮の細胞死への関与も示唆されている。これまでに我々は、オートファジー・リソソーム阻害剤が虚血性神経細胞死およびがん細胞のフェロトーシスを抑制すること、これらの細胞の示す高レベルのオートファジーがリソソーム由来活性酸素種 (ROS) 産生を促し、細胞死感受性を高めていることを明らかにした。フェロトーシスの細胞死実行には、ROS の増加に伴う膜脂質の過酸化が必要であるが、その発現や作用機序は不明である。本研究ではヒトがん細胞を使用し、抗癌剤誘導フェロトーシスにおける脂質過酸化の動態と機能を解析した。【材料と方法】 ヒトがん細胞株を培養し、細胞死誘導剤を処理しフェロトーシスを誘導した。膜脂質の過酸化を検出するため、脂質膜に入り込み酸化により蛍光波長がシフトする分子プローブを使用した。また局在を特定するため、蛍光蛋白質と各オルガネラマーカーの融合蛋白を作製し、細胞に導入した。多価不飽和脂肪酸の酸化分解産物の検出は、特異抗体による免疫蛍光抗体法で行った。【結果】 分子プローブで酸化脂質を検出すると、はじめゴルジ体周辺域に発現した膜脂質の過酸化が周囲へ拡大していく様子が観察された。この時間経過と並行し、多価不飽和脂肪酸の酸化分解産物のオルガネラ膜への蓄積が観察された。興味深いことにフェロトーシスを阻害する脂溶性抗酸化剤や鉄キレート剤は、脂質過酸化および酸化物蓄積の以後、細胞死を抑制する効果はなかった。また鉄含有酵素リボキシゲナーゼの阻害剤が脂質酸化の発現と細胞死を阻害した。【考察と結語】 抗癌剤によるがん細胞のフェロトーシスでは、膜脂質の過酸化はゴルジ・エンドソーム領域で出現するが、遊離鉄が引き起こす不飽和脂質のラジカル連鎖反応がオルガネラ全体に拡大することで細胞死にいたることが分かった。

## 19. スピンプローブ法によるフェロトーシス誘導細胞内ラジカル産生評価

瀧川 雄太<sup>1</sup>, 鳥居 征司<sup>2</sup>, 奥石 一郎<sup>1</sup>

(1 群馬大院・保・生体情報検査科学)

(2 群馬大・生調研・分泌制御分野)

【背景と目的】 フェロトーシスは、鉄依存的な新規のプログラム細胞死であり、脂質過酸化 (L-OOH) 産生を特徴とする。鉄は L-OOH に対する 1 電子レドックス反応によ

り脂質ラジカルを産生し、細胞を死に至らしめる。しかしながら、フェロトーシスに関わる脂質に関する情報は少なく、フェロトーシス誘導機構の解明の支障となっている。我々は、スピンプローブ法に用いられる安定ニトロキシルラジカルが脂質ラジカルのうち、炭素中心ラジカルと安定付加体を形成することを明らかにしてきた。本研究では、フェロトーシスに関わる脂質ラジカルに対するニトロキシルラジカルのスカベンジ効果について検討を行った。【材料と方法】 シャーレに播種した HT1080 細胞に、ニトロキシルラジカル存在下でフェロトーシスを誘導後、それぞれ① Trypan-blue Dye Exclusion Assay によって生細胞数を算定し、②光学顕微鏡および蛍光顕微鏡によって形態観察を行った。フェロトーシス誘導剤として RSL3 および Erastin を使用した。ニトロキシルラジカルとして 6 員環環状の TEMPO 系 (NH<sub>2</sub>-, OH-), 5 員環環状の PROXYL 系 (COOH-, NH<sub>2</sub>CO-, 3, 4-Δ-NH<sub>2</sub>CO-) の 5 種を使用した。蛍光プローブは、Redox Sensor Red CC-1, BODIPY-(581/591)-C11 の 2 種を使用した。【結果】 ニトロキシルラジカル存在下、HT1080 細胞にフェロトーシスを誘導したところ、COOH-PROXYL を除く 4 種がフェロトーシスの誘導を阻害した。細胞質レドックスポテンシャルの指標である Red CC-1 を用いた検討を行ったところ、PROXYL 系はフェロトーシス誘導によるレドックスポテンシャル変動をコントロールレベルにまで抑制した。また、脂質過酸化連鎖反応の指標である C11-BODIPY を用いた検討を行ったところ、ニトロキシルラジカル存在下で有意なシグナルの減弱が確認された。【考察と結語】 ニトロキシルラジカルは、脂質ラジカルをスカベンジすることでフェロトーシスの誘導を阻害することから、脂質ラジカル-ニトロキシルラジカル付加体の構造解析はフェロトーシスに関わる脂質に関する情報を取得する有力な手法になり得ることが明らかとなった。

## 20. 硫化水素-グルタチオン系による細胞内ラジカルスカベンジ作用について

永井 聖也, 川島早耶香, 奥石 一郎

(群馬大院・保・生体情報検査科学)

【背景と目的】 細胞内には、様々な抗酸化酵素が存在するが、障害性のフリーラジカル種をスカベンジする低分子抗酸化物質の本体とその作用機序に関する詳細は不明である。近年、細胞内に、サルフェン硫黄として知られる、グルタチオンパースルフィドの還元体 (G-SSH) ならびに酸化体 (G-SSS-G) が数十〜数百  $\mu$ M レベルで存在することが明らかにされた。これらは、グルタチオン存在下、硫化水素とフリーラジカル種とのラジカル反応により産生することから、我々は、硫化水素-グルタチオン系が細胞内ラジカルスカベンジ作用を担っているのではないかと考えている。しかしながら、硫化水素が持続的なラジカルスカベンジャーとして作用するためには、細胞内環境下で G-SSS-

G から硫化水素が再生されなくてはならない。本研究では、G-SSS-G から硫化水素再生の化学的反応について検討を行った。【材料と方法】 G-SH, G-SS-G, G-SSS-G, G-SSH, G-SSSH, G-SS-NAC の分離分析は、オルトフタルアルデヒドを検出試薬に用いたポストカラム誘導体化逆相 HPLC を用いて行った。【結果】 G-SSS-G に N-アセチルシステイン (NAC) を作用させると、G-SSS-G の初期濃度を超える濃度の G-SS-NAC が生成された。しかし、酸化型グルタチオンの生成は認められなかった。このことから、 $G-SSS-G + NAC-SH \rightarrow G-SSH + G-SS-NAC$  と  $G-SSH + NAC-SH \rightarrow H_2S + G-SS-NAC$  の S-S 交換反応が起きていることが明らかとなった。また、S 転移反応は認められなかった。【考察と結語】 以上より、硫化水素はチオール存在下で持続的なラジカルスカベンジャーとして機能することが明らかとなった。

## 21. グルコース感知受容体の分子実体の解明：CaSR ノックアウト細胞を用いた検討

中川 祐子<sup>1</sup>, ヨハン メディナ<sup>2</sup>, 藤谷与士夫<sup>1</sup>  
小島 至<sup>1</sup>

(1 群馬大・生調研)

(2 クイーンズランド大学)

【背景と目的】 我々は膵  $\beta$  細胞にグルコース感知性受容体 (GSR) が発現し、グルコース作用に関与することを報告してきた。GSR の分子実体を明らかにするために HEK293 細胞を用いて、様々な C タイプの G タンパク質共役受容体 (GPCR) を発現させ、グルコースによって活性化される GPCR を探索した。その結果、Calcium Sensing Receptor (CaSR) がグルコースによって活性化されることを報告した。興味あることに、CaSR が生体内で機能することが既に良く知られている副甲状腺や腎尿細管由来の培養細胞 MDCK や PT-r でも、グルコースによって CaSR が活性化されることが分かった。しかし、膵  $\beta$  細胞において CaSR がグルコースによって活性化されるか否かは明らかではない。そこで、本研究では、膵  $\beta$  細胞においても CaSR がグルコースによって活性化され、グルコース応答性インスリン分泌に関与するか否かを明らかにする。【材料と方法】 膵  $\beta$  細胞の株である MIN6 細胞を用いた。CRISPR/Cas 法により CaSR をノックアウトした細胞を作製した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) をモニターするために、Fluo-8 を用いた。【結果】 MIN6 細胞における CaSR の機能を解明するために CaSR をノックアウトした細胞を作製した。クローン化した 9 つのクローンのうち 2 つのクローンで CaSR の発現が消失した。またこのクローンは、CaSR の Negative allosteric modulator である Cinacalcet による効果が無くなっていたことから、このクローンにおいては CaSR の機能も消失していることが考えられた。このクローンを CaSR ノックアウト細胞 (casr 細胞) とし、以下の検討を行った。MIN6 細胞では、グルコースの濃度依存的に

$[Ca^{2+}]_i$  が変化するが、casr 細胞では、グルコースの濃度依存性が低下した。しかし、高濃度の KCl による  $[Ca^{2+}]_i$  の変化はコントロール細胞と同様であった。また、casr 細胞に CaSR を発現させることにより、低下したグルコース誘発性  $Ca^{2+}$  応答の低下が回復した。【考察と結語】 MIN6 細胞では、グルコースの濃度依存的に  $Ca^{2+}$  応答を示すが、casr 細胞では濃度依存性が消失した。しかし、高濃度 KCl 誘導性  $Ca^{2+}$  応答はコントロール細胞と同程度であったことから、この変化は電位依存性  $Ca^{2+}$  透過チャネルに依存したものでないことが考えられた。casr 細胞に CaSR を強制発現させることによりこの表現型が回復したことから、グルコース濃度依存性の低下は CaSR によるものであると考えられた。以上の結果から、膵  $\beta$  細胞において CaSR はグルコースの濃度依存的に  $Ca^{2+}$  シグナルを発生させる経路を制御する可能性が考えられる。

## 22. インスリンによる新奇脂肪蓄積機構の解明

歩 云, 奥西 勝秀, 泉 哲郎

(群馬大・生調研・遺伝生化学分野)

【背景と目的】 我々は、これまでに、主に成熟白色脂肪に発現し脂肪蓄積作用を有する I 型 TGF- $\beta$  受容体 ALK7 のリガンドとして、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する蛋白の一つ GDF3 を同定した。更に、この GDF3 が、白色脂肪組織中の CD11c+マクロファージから産生されること、及び、この GDF3 の発現がインスリンにより誘導されることを、昨年度の本学会で報告した。一般にインスリンは脂肪細胞に直接作用して脂肪代謝を制御することが知られているが、我々が見出した知見からは、インスリンが、マクロファージからの GDF3 の産生を誘導し、その結果、白色脂肪の ALK7 経路の活性化を介して間接的に脂肪蓄積を亢進させる可能性が考えられた。そこで、このインスリン-GDF3-ALK7 経路が脂肪蓄積に与える効果を検討した。【材料と方法】 各種マウス (インスリン抵抗性を伴う肥満・糖尿病モデル TSOD マウス、TSOD マウスに BALB/c 由来の ALK7 の変異を導入した Congenic マウス、ALK7 が保たれている C57BL/6 マウス、及び、ALK7 変異を有する BALB/c マウス) を用いて、マウスから単離したマクロファージや白色脂肪細胞を用いた ex vivo の実験や、個体レベルでの in vivo の実験を行い、インスリン-GDF3-ALK7 経路が脂肪蓄積に及ぼす効果を検討した。【結果】 インスリンは、60pM という低濃度で、脂肪組織由来マクロファージにおける GDF3 の発現を強力に誘導し、その培養上清は、脂肪細胞の Smad3 を活性化し、脂肪分解を強く抑制した。一方、脂肪細胞に直接作用して脂肪分解を抑制するためには、より高濃度のインスリンを必要とした。インスリンの in vivo 投与は脂肪蓄積を亢進させたが、その効果は、クロドロネート投与によりあらかじめマクロファージを除去したマウスや、ALK7 変異マウスでは認められなかった。【考察と結語】 インスリンによる新たな脂肪蓄